



Universitat  
Autònoma  
de Barcelona

PAPER DE L' APOPTOSI EN EL DANY  
CEL·LULAR PER ISQUÈMIA CEREBRAL:  
MECANISMES MOLECULARS IMPLICATS I  
NEUROPROTECCIÓ

Cristina Malagelada Grau

# ÍNDEX

ÍNDEX.....	I
ÍNDEX DE TAULES I FIGURES.....	IV
ABREVIATURES .....	VII
RESUM.....	VIII
AGRAÏMENTS .....	IX
<b>1. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>1</b>
1.1. LA ISQUÈMIA CEREBRAL .....	3
1.2. CONCEPTE I TIPUS D' ISQUÈMIA CEREBRAL.....	4
1.3. ALTERACIONS DE L'HOMEOSTASI IÓNICA: LA DESPOLARITZACIÓ ANÒXICA.....	6
1.4. PAPER DEL GLUTAMAT EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL: DANY EXCITOTÒXIC.....	8
1.4.1. Alliberament de glutamat.....	8
1.4.2. Excitotoxicitat i receptors glutamatèrgics.....	9
1.5. MECANISMES DE MORT CEL.LULAR EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL .....	11
1.5.1. Mort necròtica i mort apoptòtica.....	11
1.5.2. Activació de caspases en la isquèmia cerebral .....	12
1.5.3. Altres molècules clau en l'apoptosi neuronal isquèmica .....	17
1.6. PAPER DEL TNF $\alpha$ EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL.....	18
1.6.1. El TNF $\alpha$ en el SNC.....	19
1.6.2. Receptors del TNF $\alpha$ i vies de transducció associades.....	20
1.6.3. El TNF $\alpha$ en la lesió cerebral isquèmica .....	21
1.6.4. Importància del NF $\kappa$ B en la isquèmia cerebral .....	23
1.7. LA CERAMIDA .....	25
1.7.1. Síntesi de ceramida .....	25
1.7.2. Ceramida i apoptosi.....	26
1.7.3. Relació entre la ceramida i la mort apoptòtica en la isquèmia cerebral .....	28
1.8. LA HISTAMINA COM A MODULADORA DE LA LESIÓ ISQUÈMICA .....	28
1.8.1. Paper neuromodulador de la histamina en el snc.....	28
1.8.2. Recetors histaminèrgics en el snc .....	29
1.8.3. Implicació del sistema histaminèrgic en la isquèmia cerebral .....	31
<b>2. OBJECTIUS.....</b>	<b>33</b>

<b>3. MATERIALS I MÈTODES .....</b>	<b>37</b>
3.1. MATERIAL BIOLÒGIC .....	39
3.2. REACTIUS GENERALS I DE CULTIUS .....	39
3.3. PREPARACIÓ DELS CULTIUS PRIMARIS NEURONALS.....	40
3.3.1. Dissecció i obtenció dels còrtex .....	40
3.3.2. Obtenció de la suspensió cel·lular .....	40
3.4. DETERMINACIÓ DE L'ALLIBERAMENT DE [3H]-GLUTAMAT .....	41
3.5. EXPOSICIÓ A LA DEPRIVACIÓ DE GLUCOSA I OXIGEN (OGD).....	43
3.6. DETERMINACIÓ DE LA VIABILITAT CEL·LULAR .....	44
3.6.1. Assaig de la reducció del MTT .....	44
3.6.2. Determinació de l'activitat lactat deshidrogenasa .....	45
3.7. AVALUACIÓ DE LA NECROSI I L'APOPTOSI MITJANÇANT ELS MARCADORS FLUORESCENTS IODUR DE PROPIDI I HOECHST 33258 .....	46
3.8. IMMUNOCITOQUÍMICA .....	47
3.9. WESTERN BLOTT .....	48
3.10. DETERMINACIÓ DE LA PRODUCCIÓ DE TNF $\alpha$ .....	49
3.11. DETERMINACIÓ DE L'ACTIVITAT DIACILGLICEROLQUINASA : .....	50
3.12. MARCATGE METABÒLIC AMB [14C]-SERINA I [3H]-PALMITAT: .....	51
3.13. ANÀLISI ESTADÍSTICA: .....	52
 <b>4. RESULTATS.....</b>	 <b>53</b>
4.1. MORT CEL·LULAR INDUÏDA PER L'EXPOSICIÓ A UNA DEPRIVACIÓ DE GLUCOSA I OXIGEN: NECROSI VERS APOPTOSI.....	55
4.1.1. Establiment dels cultius de neurones corticals .....	55
4.1.2. Estudi de la viabilitat cel·lular dels cultius al llarg del temps.....	57
4.1.3. Establiment i caracterització del model d'isquèmia in vitro per OGD .....	59
4.1.4. Caracterització dels tipus de mort generats pel model d'OGD .....	61
4.1.5. La caspasa 3 media la condensació de la cromatina en cèl·lules sotmeses a 75'OGD.....	63
4.1.6. Localització cel·lular de l'activació de la caspasa3.....	71
4.1.7. Activació d'altres caspases en cultius sotmesos a OGD .....	75
 <b>CONCLUSIONS (I).....</b>	 <b>78</b>
4.2. MECANISMES IMPLICATS EN LA MORT APOPTÒTICA EN L'OGD .....	79
4.2.1. El TNF $\alpha$ .....	79
4.2.1.1. Efecte del TNF $\alpha$ en els cultius de neurones corticals de rata.....	79
4.2.1.2. Efecte de l'OGD sobre l'alliberació de TNF $\alpha$ en els cultius de neurones corticals de rata.....	83
4.2.1.3. Efectes del TNF $\alpha$ alliberat en una OGD .....	85

<b>CONCLUSIONS (II)</b> .....	<b>88</b>
4.2.2. LA CERAMIDA .....	89
4.2.2.1. L'OGD indueix una acumulació de ceramida .....	89
<b>CONCLUSIONS (III)</b> .....	<b>96</b>
4.2.3. EL NFκB .....	97
4.2.3.1. El TNFα activa el NFκB .....	97
4.2.3.2. L'OGD activa el NFκB.....	98
4.2.3.3. Efecte del bloqueig del NFκB en una OGD.....	100
4.2.3.4. Efecte del bloqueig del TNFα sobre el NFκB en una OGD. ....	102
4.2.3.5. Efecte del bloqueig de la síntesi de novo de ceramida sobre el NFκB en una OGD.....	103
<b>CONCLUSIONS (IV)</b> .....	<b>105</b>
4.3. APLICACIÓ DEL MODEL D'OGD PER VALORAR FÀRMACS POTENCIALMENT NEUROPROTECTORS.....	105
4.3.1. Efecte dels diferents antagonistes de la histamina en cultius neuronalns exposats a l'OGD .....	105
4.3.2. Estudi dels receptors de la histamina H2 en cultius neuronalns exposats a l'OGD .....	106
4.3.3. Efecte dels antagonistes H2 sobre l'activació de la caspara 3 induïda per OGD.....	108
4.3.4. Finestra terapèutica dels antagonistes H2 en l' OGD .....	110
<b>CONCLUSIONS (V)</b> .....	<b>115</b>
<b>5. DISCUSSIÓ</b> .....	<b>117</b>
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>143</b>

## ÍNDIX DE TAULES I FIGURES

### FIGURES:

Figura 1.1. Nucli i penombra en una isquèmia cerebral .....	5
Figura 1.2. Metabolisme i transportadors del glutamat.....	8
Figura 1.3. Receptors ionotròpics i metabotròpics del glutamat en una terminal sinàptica ....	9
Figura 1.4. Mecanismes de mort cel.lular en una isquèmia cerebra.....	13
Figura 1.5. Vies d'activació de la caspasa 3.....	16
Figura 1.6. Regulació de l'apoptosi.....	18
Figura 1.7. El receptor TNFRI .....	20
Figura 1.8. El paper del NFkB en una lesió isquèmica cerebral.....	24
Figura 1.9. Efecte del TNF $\alpha$ en la isquèmia cerebral .....	27
Figura 1.10. Vies de senyalització activades pels receptors d'Histamina.....	30
Figura 4.1. Condicions per a l'obtenció de cultius primaris de neurones corticals de rata .....	56
Figura 4.2. Corva de viabilitat de neurones corticals cultivades segons el patró de la condició 7.....	58
Figura 4.3. Viabilitat cel.lular en funció de la durada de l'OGD.....	59
Figura 4.4. Quantificació <i>in situ</i> de la necrosi i l'apoptosi induïda per diferents períodes d'OGD .....	62
Figura 4.5. Contribució de la necrosi i l'apoptosi en funció de la durada de l'OGD .....	63
Figura 4.6. L'exposició a l'OGD activa la caspasa 3 .....	64
Figura 4.7. Efecte del Z.VAD.FMK en l'apoptosi induïda per OGD .....	66
Figura 4.8. La necrosi i l'apoptosi induïdes per OGD es donen de manera simultània però en cèl·lules diferents.....	67
Figura 4.9. Curs temporal d'activació de la Caspasa 3 .....	68
Figura 4.10. L'OGD activa la caspasa 3 en neurones.....	72
Figura 4.11. El marcador NeuN és més resistent a l'exposició de l'OGD .....	73
Figura 4.12. L'exposició a l'OGD no indueix una activació de la caspasa 3 en astròcits.....	74
Figura 4.13. L'OGD indueix una activació de la caspasa 3 en microglia.....	74
Figura 4.14. Activació de la caspasa 7 induïda per OGD en diferents espècies cel.lulars .....	76
Figura 4.15. Activació de la caspasa 9 en neurones i microglia després de l'OGD.....	77
Figura 4.16. Viabilitat cel.lular en funció de la concentració de TNF $\alpha$ .....	79
Figura 4.17. El TNF $\alpha$ indueix condensació de cromatina en funció de la concentració .....	80
Figura 4.18. El TNF $\alpha$ activa la caspasa 9 .....	81
Figura 4.19. El TNF $\alpha$ activa la caspasa 3.....	82
Figura 4.20. El TNF $\alpha$ activa la caspasa 3 en microglia.....	83

Figura 4.21. L'OGD indueix un alliberament de $TNF\alpha$ .....	84
Figura 4.22. Efecte de l'anticòs anti- $TNF\alpha$ sobre la mort cel.lular induïda per OGD.....	85
Figura 4.23. Efecte de l'anticòs anti TNF sobre l'activació de la caspasa 3 induída per OGD .....	86
Figura 4.24. L'anticòs anti $TNF\alpha$ no afecta a l'activació de la caspasa 7 i de la caspasa 9.....	87
Figura 4.25. La Fumonisina B1 protegeix de la mort induïda per OGD .....	90
Figura 4.26 La fumoinisina B1 bloqueja l'acumulació de ceramida en cèl.lules exposades a l'OGD.....	91
Figura 4.27 La fumoinisina B1 redueix el nombre de nuclis apoptòtics en cultius exposats a l'OGD .....	91
Figura 4.28 La fumoinisina B1 redueix el nombre de nuclis apoptòtics en cultius exposats a l'OGD .....	92
Figura 4.29 La fumoinisina B1 redueix l'activació de la caspasa 3 en neurones de cultius exposats a l'OGD.....	93
Figura 4.30. La fumoinisina B1 redueix l'activació de la caspasa 3 en neurones de cultius exposats a l'OGD.....	94
Figura 4.31. La fumoinisina B1 redueix la síntesi de novo de ceramida induída per OGD.....	95
Figura 4.32. La fumoinisina B1 no redueix la degradació d'esfingomielina induída per OGD.....	96
Figura 4.33. El $TNF\alpha$ activa el $NF\kappa B$ .....	98
Figura 4.34. L'OGD indueix la translocació a nucli del $NF\kappa B$ .....	99
Figura 4.35. La translocació a nucli del $NF\kappa B$ induïda per l'OGD col.localitza amb les cèl.lules apoptòtiques.....	99
Figura 4.36. El bloqueig de la translocació del $NF\kappa B$ redueix la mortalitat cel.lular induída per OGD.....	100
Figura 4.37. L'inhibidor del $NF\kappa B$ redueix l'activació de la caspasa 3 induïda per OGD .....	101
Figura 4.38. L'anticòs anti $TNF\alpha$ redueix la translocació del $NF\kappa B$ induïda per OGD .....	102
Figura 4.39. L'anticòs anti $TNF\alpha$ redueix la translocació del $NF\kappa B$ i l'activació de la caspasa 3 induïdes per OGD .....	102
Figura 4.40. La fumoinisina redueix la translocació del $NF\kappa B$ .....	103
Figura 4.41. Efecte dels antagonistes dels diferents receptors histaminèrgics sobre la mort cel.lular induïda per OGD .....	106
Figura 4.42. Efecte dels agonistes i dels antagonistes del receptor H2 en l'OGD.....	107
Figura 4.43. Efecte de la Ranitidina sobre la necrosi i l'apoptosi induïdes per l'OGD .....	107
Figura 4.44. Efecte de la Ranitidina sobre la degradació de la MAP2 i l'activació de la caspasa 3 .....	109
Figura 4.45. Efecte de la Ranitidina sobre la necrosi i l'apoptosi induïdes per l'OGD .....	109

Figura 4.46. Efecte del tractament post OGD amb Ranitidina .....	111
Figura 4.47. Efecte del tractament post OGD amb Tiotidina .....	111
Figura 4.48. Efecte del tractament post OGD amb Ranitidina en l'apoptosi i la necrosi .....	112
Figura 4.49. Efecte del tractament post-OGD amb Ranitidina vers l'activació de la caspasa 3.....	114

### **TAULES:**

Taula 1.1. Antecedents de la implicació del sistema histaminèrgic en la isquèmia cerebral ...	31
Taula 3.1. Solucions utilitzades en els experiments d'alliberament de [ <sup>3</sup> H]-glutamat .....	41
Taula 3.2. Criteris de discriminació entre necrosi i apoptosi.....	47
Taula 4.1. Efecte dels antagonistes dels receptors ionotròpics del glutamat en l'OGD.....	60
Taula 4.2. Localització cel.lular de les caspases activades per OGD.....	78

**ABREVIATURES**

- AMPA:**  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propionàic àcid
- Ara C:** citosina arabinofuranòsid
- BME:** medi basal Eagle
- BSS:** solució salina basal
- DIV:** dies *in vitro*
- DMSO:** dimetilsulfòxid
- DNA:** àcid desoxiribonucleic
- Dpm :** desintegracions per minut
- EDTA:** etilendinitriлотetraacetat de sodi
- FCS:** sèrum fetal boví
- FHS:** sèrum de cavall
- KRB:** tampó Krebs-Ringer
- LDH:** lactat deshidrogenasa
- mg:** mil·ligram
- ml:** mil·lilitre
- mM:** milimol/litre
- MTT:** Bromur de 3-[4,5-Dimetiltiazol-2-il]-2,5, difeniltetrazoli
- NF $\kappa$ B:** factor nuclear kappa B
- nm:** nanòmetre
- nM:** nanomol/litre
- NMDA:** N-metil-D-aspartat
- OGD:** deprivació d'oxigen i glucosa
- PBS:** solució salina tamponada amb fosfat
- PI:** Iodur de Propidi
- PMSF:** fluorur fenilmetilsulfònic
- SDS:** dodecilsulfat sòdic
- SMA $\alpha$ :** Esfingonmielinasa àcida
- TBS:** 50mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl
- TBST:** 50mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.1% Tween
- TEMED:** N,N,N',N'-tetrametiletilediamina
- TLC:** de l'anglès thin layer chromatography o cromatografia en capa fina
- TNF $\alpha$ :** tumor necrosis factor  $\alpha$
- $\mu$ g :** microgram
- $\mu$ l:** microlitre
- $\mu$ M:** micromol/litre



## Resum

La isquèmia cerebral es caracteritza per una interrupció del flux sanguini, la qual cosa comporta una mort neuronal de la zona afectada. Els mecanismes cel·lulars i moleculars de la mort neuronal induïda per isquèmia es desconeixen però s'ha proposat que la depleció d'energia i la pèrdua dels gradient iònics provocarien un alliberament de glutamat, que és el neurotransmissor excitatori majoritari en sistema nerviós central de mamífers, per la reversió de la funció dels seus recaptadors de membrana. L'acumulació de glutamat comporta una sobreexcitació dels seus receptors sinàptics i desencadena una mort neuronal fulminant. Tradicionalment, aquesta mort cel·lular s'ha descrit com una mort per necrosi, però en els darrers anys, s'ha descrit l'existència d'un altre component de mort, més retardat, anomenat apoptosi. En el present treball s'ha establert un model d'isquèmia *in vitro* per deprivació d'oxigen i glucosa (OGD), en cultius primaris de neurones corticals de rata. El model ha permès estudiar els mecanismes que s'activen en una isquèmia cerebral i que porten a una mort neural la qual ve mediada, principalment, pel glutamat via receptor NMDA. S'ha pogut caracteritzar i quantificar la necrosi i l'apoptosi induïda per l'exposició a l'OGD. A més, l'aparició de l'apoptosi correlaciona amb l'activació de la caspasa 3, un dels marcadors més rellevants de la mort cel·lular programada, i també de les caspases 7 i 9. L'exposició a l'OGD també induïx l'alliberament de  $TNF\alpha$ , la síntesi de ceramida *de novo* i la translocació a nucli del factor de transcripció NFkB, els quals medien part de l'activació de la caspasa 3 i per tant part de l'apoptosi isquèmica. D'altra banda, el model ofereix la possibilitat de controlar la finestra temporal d'intervenció farmacològica, i permet determinar l'efectivitat de les substàncies abans, durant i després de l'OGD. En estudiar el sistema histaminèrgic en l'exposició a l'OGD es va concloure que els antagonistes dels receptors H2 de la histamina, i principalment la ranitidina, disminueixen la mort cel·lular induïda per OGD majoritàriament reduint l'activació de la caspasa 3. El seu efecte neuroprotector podia observar-se fins i tot administrant l'antagonista H2 tres i sis hores després de l'exposició a l'OGD i sense pretractament. Tots aquests resultats van servir per validar el model d'isquèmia *in vitro* per a l'estudi dels mecanismes cel·lulars i moleculars implicats en la isquèmia cerebral.

## AGRAÏMENTS

Aquesta part pot ser una mica conflictiva per si no esmento a algú o per si no sóc prou agraïda, no patiu perquè segurament ho hauré fet expressament! Diuen que tendeixes a oblidar les experiències negatives, no??? Bromes a part, miraré de fer referència a totes aquelles persones que m'han donat un cop de mà en aquests anys de doctorat, que tot i que la feina ha estat feixuga, a nivell socio-personal han estat dels millors anys de la meva vida.

Primer de tot he d'agrair als meus directors de tesi per haver-me acceptat al seu grup de treball:

Te'n recordes Pepi, aquell dia que vas entrar al despatx preguntant per si coneixia algú per demanar una beca??? La vam ben liar eh? Espero que tot hagi estat per a bé. T'he d'agrair una infinitat de coses, la manera que m'has ensenyat a estructurar la feina, la manera de dissenyar els experiments, els ànims en moments molt difícils, els centenars de milers de llances que has anat trencant sempre a favor meu i sobretot, sobretot, t'agraeixo el fet d'haver-me ensenyat que es gaudeix molt més de la ciència tenint cura de la seva part humana, és a dir, de la gent que hi treballa, i que sense aquest caliu tot es converteix en una rutina nefasta.

A tu Pepe, t'agraeixo la possibilitat que em vas donar de fer el doctorat en el teu grup, per la manera que hi he après a fer ciència i per l'autonomia que m'has deixat en el laboratori. No et puc agrair els articles però espero fer-ho algun dia...!

Als meus companys de grup, en Xavi, l'Alfredo, en Virgili i en els últims mesos en Daniel.

Xavito Cabrón de Borbón, a tu t'he d'agrair tot el recolzament que m'has donat en forma d'ironia i atacs de riure, per escoltar les meves ratllades monumentals i altres confidències, per ser un bon informador, per ser la meva inspiració a l'hora de

comprar-me pijames d'estiu i per no roncar a les nits de congrés. La nostra complicitat passarà a la història!!!

A tu Alfredo, t'agraeixo la teva visió benèvola de les coses, per ser com un bàlsam i no ser d'orxata i per les teves aportacions estel·lars que ens han fet tronxar de riure com allò dels chickipoints. Alfredo i Xavi, gràcies per cuidar-me tant

A la gent del departament:

Als meus companys de e-mails càustics i polèmics: a l'Alberto, per haver portat una altra realitat al dept. i fer-nos discutir intensament de problemes politico-socials i per haver volgut aprendre el Gironí. Àlex, gràcies per la teva ironia que m'ha fet partir de riure tot aquest temps. No havia trobat mai ningú que digués tant amb només un pujar i baixar de cella. Ets un bronques amb elegància!!!

A en Mel, per no engegar-me a la merda per totes les coses que li he demanat durant aquests anys. Merci per la teva paciència, per les paraules amables que m'has dedicat, per presidir el meu club de fans, juntament amb el club de fans de l'Aramis Fuster i per haver-me recomanat a la Evelyn Champagne! Ara, el dia que entengui això que em dius de ser borbònic carlista catalanista hauré vist la llum del mestre que ets!!!

Sandra, merci per la teva amistat i pel teu suport moral! Per aguantar-me els mals i els bons moments i, per atrevir-te a cantar amb mi "el tal.l.l.l.isman" al karaoke Marfil, per convèncer'm d'anar al SAF i pels atacs de riure fent aeròbic, per les innumbrables nits de farra que van des de carnivals tremendos que han donat molt que parlar fins a suarés perilloses al Sutton! Per molts anys!

Anna Torrent, has estat la veu de la consciència, un pou de ciència en temes de psicopatologia conjugal, merci per les empentes en moments clau, per les anades al SAF i les teràpies de tapes i cervesa a l'Alaska. Ens hem fet costat al lab, en l'escriptura de la tesi i en 50.000 situacions més. Continua així de feliç, com un anís!!!

Noe, ets la millor psicobioquímica que he conegut mai i merci pels júa júa improvisats al despatx; Mar, vas tenir una gran idea acompanyant el wiski amb palitos en forma de

calamar; Eli, espero amb ànsies veure els nostres articles al Journal of Trikitrí; Rosa i Iman, gràcies per formar part del sector dur femení! Raúl, merci per proporcionar-nos una imatge de National Geographic el dia que ens va ensenyar aquell bé de déu de pèl que tens a la panxa. A l'Enrique i la Belén, per la col.laboració lipídica i per les discussions de ciència i no-ciència sempre interessants.

Cris G., merci per ser la millor cultivadora de cèl·lules del món mundial, m'has ajudat moltíssim en la meva feina i m'has estalviat moltes hores de treure meninges, ja saps que si mai arribem a publicar al Journal of Trikitrí el teu nom també hi serà, mal et pesi!!!! A l'altra gent del departament que en algun moment o altre m'han donat un cop de mà, moltes gràcies!

A l'Òscar pels caramels i ser l'eficiència personificada A l'Isabel per no arrencar-se a córrer en veure el panorama . A en Manel per ajudar-me amb la part tècnica dels experiments.

I a en Salvador Bartolomé, pel suport tècnic rebut al microscopi (i que sense tu no hi hauria cap foto en aquesta tesi. La teva ajuda ha estat imprescindible, crucial, estupenda fantàstica... no tinc prou paraules !!!)

Als meus amics fora del dept.:

A la Bet i a l'Eva per les reunions *tuperware* que hem anat fent periòdicament, era com anar a teràpia de grup! Gràcies per la vostra amistat, per la vostra visió pràctica de les coses! La meva petita família a Cerdanyola del Vallès!!!

A les del pis, en tots aquests anys, per ser tan estupendes i fer del pis un lloc ben acollidor!

A la Sara, l'Elo i la Bibi, per ser amigues meves, amb tot el que això comporta: taladrades varies, eskàndols diversos, consells durs però pràctics i les millors "fiestas" del món !! Això de la fase experimental que duri molt sisplau que m'ho estic passant

teta jajaja A la resta de la colla a en Xevi G, en Chiqui i els seus hombros, en Trumfo, en Litus i l'Elsa De la Fuente, en David , l'Avi i la resta de la gent!!

A en Jose Morón per haver-me ajudat sempre en moments molt decisius com fou el canvi de grup, trobar-nos a San Diego o bé tot això del postdoc!!! Un petó ben gros! A en Joan Marc, en Marc, l'Àlex, la Maribel, la Pili (Pinki's power) i la Bet Sarri, per haver-me ajudat els primers anys de començar aquest sidral que és el doctorat, per ensenyar-me que per sobreviure has d'anar a la teva bola, que t'has d'espavilar i ser autosuficient i que, de tant en tant, has d'organitzar sopars per destensionar l'ambient (sempre i quan portis ulleres de recanvi, eh Marc??!!)

I finalment als meus pares i al meu germà que han estat la peça clau de tot plegat, sense ells no crec que hagués acabat la tesi, perquè n'hi ha hagut per engegar-ho tot a rodar més d'una vegada. Sempre que he caigut m'han ajudat a espolsar-me i a continuar endavant, els dec la tenacitat, la insistència i ... vaja, tot, tot i tot!. El vostre esforç , l'ajuda i la vostra paciència són els fonaments d'aquesta tesi!!!

I com que això ja està semblant un discurs d'agraïments de la cerimònia dels Oscar, ja paro. Si algú té alguna cosa a dir que m'envïi un e-mail o que calli per sempre, que 4 planes d'agraïments ja és molt!

***Je me révolte, donc je suis.***

**Albert Camus (1913-1960)**

JOSEFA SABRIÀ PAU, Doctora en Química i Professora titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona i

JOSEP RODRÍGUEZ ÁLVAREZ Doctor en Bioquímica i Biologia Molecular, Director de l'Institut de Neurociències i Professor titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona

CERTIFIQUEN: que la tesi "***Paper de l'apoptosi en el dany cel.lular per isquèmia cerebral: mecanismes moleculars implicats i neuroprotecció***", que presenta Cristina Malagelada Grau per optar al grau de Doctora ha estat realitzada sota la seva direcció en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona i es troba en condicions de ser llegida.

Bellaterra, 24 d'Abril de 2003

Dra. Josefa Sabrià Pau

Dr. Josep Rodríguez Álvarez

## **1. INTRODUCCIÓ**



## 1.1. LA ISQUÈMIA CEREBRAL

En la majoria dels països industrialitzats , la isquèmia cerebral és la tercera causa de mort, rere les cardiopaties i el càncer. Té una incidència de 250-400 casos per cada 100.000 habitants i la seva mortalitat és d'un 30%. El 60% dels supervivents viu tres anys i la meitat dels restants, en viuen només cinc. A més, un 40% sofreix incapacitats físiques i laborals cròniques que fan disminuir la seva qualitat de vida i incrementen notablement la despesa sanitària (Farreras P. & Rozman C.,1992). És aquest impacte socio-econòmic el que situa la isquèmia cerebral en un lloc prioritari dins la recerca científica actual. L'estudi dels seus mecanismes cel.lulars i moleculars és primordial per al disseny i l'èxit de teràpies neuroprotectores.

Per mantenir una activitat cerebral cal una irrigació sanguínia constant. L'encèfal, que representa un 2 % del pes corporal, consumeix un 18 % de l'oxigen utilitzat per l'organisme i un 17% de la glucosa en condicions basals, i pel seu funcionament requereix una cinquena part de la sang bombejada pel cor. Tenint en compte que el cervell no resta mai en repòs absolut i depèn constantment pel seu funcionament de l'oxigen i de la glucosa sanguinis, uns pocs segons de col·lapse vascular alteren el funcionament neuronal produint una pèrdua de consciència. Al cap de dos minuts de la interrupció del flux sanguini, cessa el metabolisme neuronal i després de cinc minuts es produeixen lesions irreversibles per mort neuronal. (Castillo J. & Noya M., 1993)

## 1.2. CONCEPTE I TIPUS D'ISQUÈMIA CEREBRAL

Els accidents cerebrovasculars són la conseqüència de processos patològics que afecten els vasos sanguinis cerebrals. Els traumatismes craneoencefàlics, però, també presenten les mateixes conseqüències. La causa més freqüent dels accidents cerebrovasculars és l'oclusió de les artèries intracerebrals o extracranials per trombosi o embòlia, originada en el propi arbre arterial. Els embolismes de caire cardíac en són una contribució també important. A part de les arteriosclerosi com a origen de l'oclusió arterial, hi ha altres patologies implicades que van des de les arteritis infeccioses o associades a les drogues d'abús, fins a alteracions hematològiques o la migranya. Els factors de risc d'aquesta malaltia són l'hipertensió arterial, el tabaquisme, l'obesitat o la hipercolesterolèmia (Farreras P.& Rozman C.,1992)

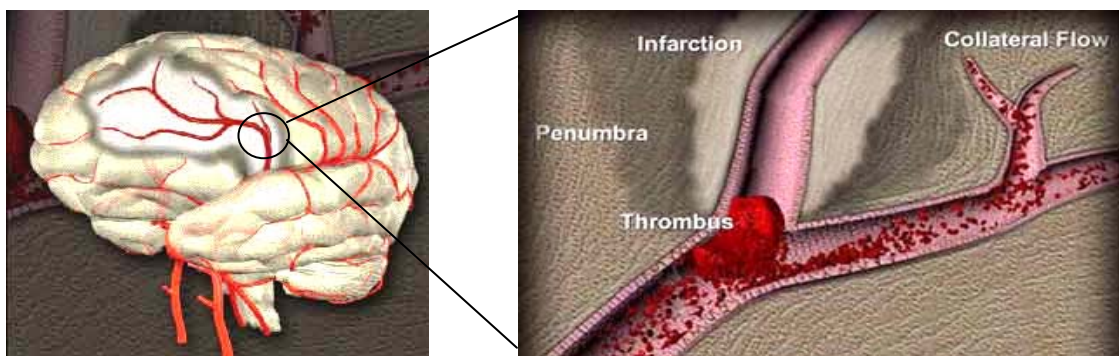
Des del punt de vista clínic, els accidents cerebrovasculars o ictus poden dividir-se en:

- **Accidents isquèmics transitoris:** que són episodis de dèficits d'origen vascular d'aportació sanguínia a nivell focal, generalment d'instauració brusca, amb una recuperació completa de la funció neurològica alterada en el curs de les 24 hores posteriors a l'aparició del quadre clínic.
- **Infarts cerebrals:** que són el conjunt de manifestacions patològiques que apareixen com a conseqüència de l'alteració qualitativa o quantitativa de l'aportació circulatòria en una determinada zona encefàlica. Això determina un dèficit neurològic que dura més de 24 hores i que suposa l'aparició de necrosi tissular (Martí-Vilalta JL., 1993)

Si s'obturen els vasos que irriguen tot el cervell, la lesió rep el nom d'**isquèmia global**. En canvi, si només es produeix la oclusió de vasos que irriguen una zona determinada, la lesió s'anomena **isquèmia focal** (Garcia JH.,1975). En ambdós casos, segons la durada de la isquèmia, els episodis reben el nom de **transitoris o**

**permanents.** La isquèmia focal i la isquèmia global són situacions força diferents. La isquèmia global es caracteritza per ser un esdeveniment curt però molt intens. Tot i que la isquèmia resulta ser uniforme, la mort cel.lular es presenta de forma molt selectiva. D'altra banda, la isquèmia focal és un procés molt més complex que implica gradació del dany en la zona infartada i, conseqüentment, l'activació de diversos mecanismes de mort (Lipton P.,1999).

En la isquèmia focal, l'obstrucció d'un vas sanguini produeix un gradient de la lesió que es caracteritza per una isquèmia intensa en el centre del territori vascular afectat i una isquèmia menys severa en la seva perifèria. Les cèl.lules del **nucli isquèmic** moren en pocs minuts i la zona presenta una necrosi tissular evident. En canvi, la zona més perifèrica o **penombra isquèmica**, les neurones mostren alteracions de caràcter funcional tot i que conserven una mínima activitat metabòlica que fa que preservin la seva integritat estructural durant algun temps més (Hossman KA., 1994) (vegeu figura 1.1).



**Figura 1.1. Nucli i penombra en una isquèmia cerebral.** Les imatges mostren una lesió isquèmica deguda a un coàgul que obstrueix un vas sanguini. La imatge de l'esquerra mostra una visió general de l'afectació de l'encèfal. La imatge de la dreta detalla el coàgul en el vas sanguini i el gradient isquèmic que produeix en el teixit circumdant. Recurs [www.strokecenter.org](http://www.strokecenter.org)

La progressió de la lesió en la penombra isquèmica depèn de molts factors, principalment de la circulació col·lateral romanent. La importància de la penombra isquèmica rau en la hipòtesi que les neurones de la perifèria de l'infart que sobreviuen,

poden recuperar-se en restablir-se el flux sanguini. El disseny de teràpies efectives capaces de recuperar aquesta població cel·lular és l'objectiu principal en el tractament de la isquèmia cerebral. L'ús exclusiu de glucosa per a obtenir energia a partir de la fosforilació oxidativa i l'escàs marge d'emmagatzematge d'aquest substrat en les cèl·lules neurals, que obliga una perfusió constant, confereixen l'alta vulnerabilitat del teixit nerviós vers altres teixits de l'organisme. Però aquesta **vulnerabilitat** es presenta de manera **selectiva** ja que en zones del teixit irrigades per una mateixa distribució vascular hi ha poblacions neuronals molt més sensibles que d'altres. Les poblacions neuronals més sensibles són principalment les neurones piramidals corticals, les cèl·lules de Purkinje del cerebel, les neurones hipocampals de la capa CA1 i altres subpoblacions de l'amígdala, l'estriat i el tàlem. Les causes d'aquesta heterogeneïtat romanen desconegudes però els factors intrínsecs del teixit i la naturalesa glutamatèrgica de les neurones més vulnerables podrien explicar-ne la seva alta susceptibilitat (Cervos-Navarro J. et al., 1991; Dugan L. et al., 1999).

### **1.3. ALTERACIONS DE L'HOMEOSTASI IÓNICA: LA DESPOLARITZACIÓ ANÒXICA**

La davallada brusca de la concentració de glucosa i de la pressió parcial de l'oxigen en una zona afectada per una isquèmia produeix la inhibició de la cadena de transport electrònic mitocondrial i, en conseqüència, el bloqueig de la fosforilació oxidativa. La disminució de la pressió parcial de l'O<sub>2</sub> inhibeix la citocrom oxidasa de la cadena de transport electrònic, la qual cosa comporta la pèrdua del gradient electroquímico mitocondrial necessari per a la producció d'ATP per les FoF1-ATPases. Les cèl·lules passen a obtenir l'ATP de la glicòlisi anaeròbia, de rendiment molt menor. Els productes finals de la via són lactat i protons, els quals fan disminuir ràpidament el pH intra i extracel·lular. L'entorn de la lesió isquèmica s'acidifica i la integritat neuronal

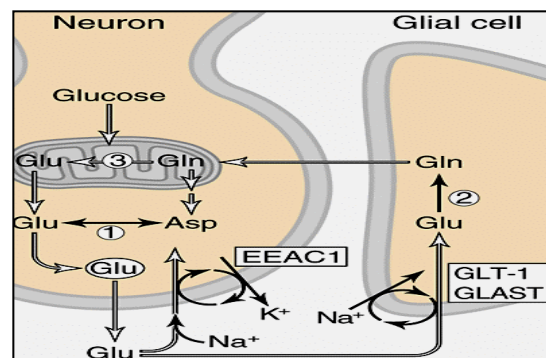
queda compromesa. A més, la depleció d'energia afecta al correcte funcionament dels sistemes cel·lulars actius dependents d'ATP (Katsura K. et al., 1993). S'atura el funcionament de les bombes de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  i hi ha una entrada de  $\text{Na}^+$  a l'interior de les cèl·lules. Aquest influx va acompanyat d'una sortida massiva de  $\text{K}^+$  a l'espai extracel·lular que desencadena una important despolarització de membrana. Les despolaritzacions es succeeixen de manera recurrent i indueixen un silenci elèctric a la zona infartada. Aquesta successió d'esdeveniments es coneix amb el nom de **despolarització anòxica** (Katsura K 1994).

## 1.4. PAPER DEL GLUTAMAT EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL: DANY EXCITOTÒXIC

### 1.4.1. ALLIBERAMENT DE GLUTAMAT

Durant la isquèmia esdevé un alliberament de neurotransmissors a l'espai extracel.lular. La despolarització anòxica produeix una entrada de calci a través dels canals de calci dependents de voltatge que desencadena una alliberació dels *pools* vesiculars de neurotransmissors, entre ells el glutamat, que és el neurotransmissor majoritari en el sistema nerviós central. Els processos que depenen de l'ATP, com ara la recaptació presinàptica i glial de glutamat, queden suspesos. Si bé en condicions normals els transportadors de glutamat són electrogènics (vegeu Figura 1.2) transferint una càrrega positiva a l'interior de la cèl·lula, en una isquèmia la despolarització de membrana desencadena una reversió en la funció dels transportadors.

**Figura 1.2. Metabolisme i transportadors del glutamat.** Un cop alliberat a la fenedura sinàptica, el glutamat és recaptat per la glia pel transportador GLT-1 i pel transportador de glutamat-aspartat GLAST. Les terminals glutamatèrgiques també poden recaptar el glutamat per mitjà del transportador d'aminoàcids excitatoris 1 o EAAC1. Tots tres transportadors depenen del gradient de sodi per desenvolupar la seva funció. Siegel et al., Basic Neurochemistry, 6<sup>th</sup> edition.(1999)

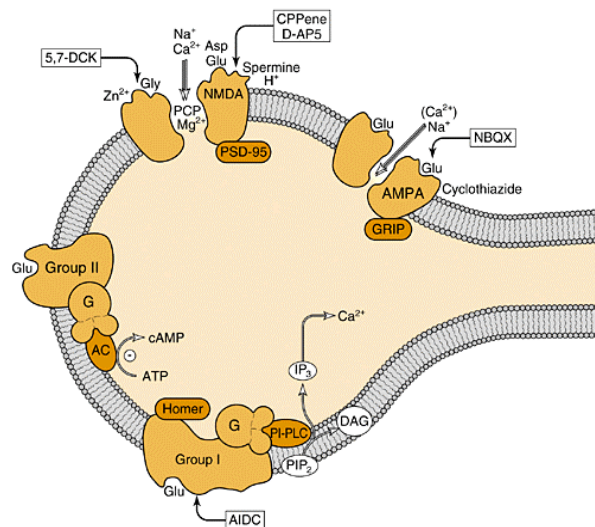


La reversió dels recaptadors contribueix a augmentar encara més la concentració de glutamat a l'espai extracel.lular fins a nivells tòxics (Benveniste H. et al.,1984; Nicholls D. et al., 1990; Rossi DJ. et al., 2000).

### 1.4.2. EXCITOTOXICITAT I RECEPTORS GLUTAMATÈRGICS

En la fenèdura sinàptica, el glutamat interacciona amb els seus receptors, els quals es poden dividir en dues grans categories, els receptors ionotròpics i els receptors metabotròpics (vegeu figura 1.3). Els receptors metabotròpics tenen sistemes de transducció de senyals acoblats a proteïnes G, que modulen la concentració de

**Figura 1.3. Receptors ionotròpics i metabotròpics del glutamat en una terminal sinàptica.** Alguns dels antagonistes competitius de cada receptor estan encabits dins dels recuadres. El receptor NMDA està representat amb alguns dels seus moduladors com els  $H^+$ , el  $Zn^{2+}$ , la glicina (Gly) i l'espermina; el  $Mg^{2+}$  i el PCP bloquegen el canal iònic. La ciclotiazida inhibeix la desensibilització dels receptors AMPA. Els receptors metabotròpics dels grups II i III estan esquematitzats junament amb els diferents mecanismes de transducció de senyals Siegel et al., Basic Neurochemistry, 6<sup>th</sup> edition.(1999)



missatgers secundaris com l'AMPc, el  $Ca^{2+}$  o l'Inositol 1,4,5 tris-Fosfat ( $IP_3$ ). Els receptors ionotròpics són canals iònics que s'obren amb la interacció del seu agonista. N'hi ha de tres tipus: els receptors N-metil-D-aspartat (NMDA), els receptors  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-isoxazol-4-propionàic àcid (AMPA) i els receptors Kainat (Ottersen et al.,1997; Palmada M. et al.,1997) .

L'augment en la concentració d'aminoàcids excitatoris a nivell extracel.lular es tradueix en una sobreactivació tòxica dels receptors que desencadena una mort neuronal. Aquest fenomen rep el nom d'**excitotoxicitat** i pot contribuir a la patogènesi del dany cerebral o de la medul·la espinal. L'excitotoxicitat és molt específica a nivell cel.lular i es creu que ve mediada principalment pels receptors del glutamat. La isquèmia cerebral doncs, produeix un alliberament de glutamat que provoca una

sobreestimulació dels receptors NMDA, AMPA i Kainat. Aquesta activació reiterada dels receptors desencadena una entrada massiva de  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  pels seus canals. Simultàniament, i per contrarestar l'entrada catiònica, hi ha una entrada de  $\text{Cl}^-$  i d'aigua (Dirnagl U. et al., 1999). Aquesta situació rep el nom d'**edema cerebral**, el qual pot acabar afectant la membrana plasmàtica fins a trencar-la. La pressió que pot exercir l'edema cerebral dins la cavitat rígida intracranial pot restringir el flux sanguini d'altres zones circumdants i generar així una isquèmia secundària (Siegel GJ. et al., 1999). Pel que fa a la contribució relativa de cada tipus de receptor de glutamat a la mort neuronal excitotòxica, val a dir que no és homogènia:

- **El receptor NMDA:** Arran dels estudis que descriuen la supervivència neuronal vers una isquèmia en presència d'antagonistes del receptor en qüestió, es va concloure que el receptor NMDA estava implicat en la toxicitat del glutamat i que desencadenava una mort cel.lular ràpida (Goldberg MP et al., 1993; Lipton P., 1999). L'activació persistent del receptor NMDA contribueix principalment a la mort excitotòxica perquè desencadena entrades de calci, d'una manera ràpida i sostinguda. El receptor NMDA pot ser modulats per múltiples factors, com la glicina, poliamines, protons, òxid nítric, àcid araquidònic, magnesi, zinc, calci, agents redox i té residus fosforilables (Szatkovsky M. et al., 1994). Això el converteix en una potencial diana terapèutica molt versàtil.
- la sobreactivació **dels receptors AMPA i KAINAT** sembla mediar la mort excitotòxica d'una manera més lenta. Ambdós tipus de receptors són principalment permeables a  $\text{Na}^+$  i, en menor proporció, al  $\text{Ca}^{2+}$ , a diferència del receptor NMDA. D'altra banda hi ha subpoblacions neuronals que expressen receptors AMPA/KA permeables al calci que també poden sobrecarregar les neurones de Calci, però d'una manera més lenta (Nellgard B. et al., 1992).



- I finalment, els **receptors metabotròpics** del glutamat no semblen contribuir d'una manera directa a l'excitotoxicitat però poden modular-la tant positiva com negativament, a través dels seus missatgers secundaris (Lee JM. et al.,1999).

## **1.5. MECANISMES DE MORT CEL.LULAR EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL**

### **1.5.1. MORT NECRÒTICA I MORT APOPTÒTICA**

Els mecanismes d'excitotoxicitat semblen ser els principals responsables del dany tissular en una lesió isquèmica. La zona del nucli isquèmic presenta una mort cel.lular aguda pocs minuts després d'iniciar-se la isquèmia. Aquest mecanisme ràpid de mort cel.lular es coneix amb el nom de **necrosi** ( Brown AW., 1972; Lipton P. 1999) Els trets bàsics de la necrosi són la pèrdua de l'homeostasi iònica, l'inflament cel.lular, el col·lapse del potencial de la membrana mitocondrial, l'inflament del nucli, el trencament de la membrana plasmàtica, el vessament del contingut citoplasmàtic a l'espai extracel.lular i l'activació de la resposta inflamatòria *in vivo*. La necrosi és un procés que no depèn de la síntesi *de novo* de proteïnes per part de la cèl.lula afectada. En paral·lel, els mecanismes excitotòxics també poden iniciar esdeveniments moleculars que condueixen a una mort neuronal més retardada. Aquest tipus de mort es dona en la penombra isquèmica i pot aparèixer al cap de dies o setmanes després de l'íctus. Aquest tipus de mort programada, que es coneix amb el nom d'**apoptosi** (Kerr JFR. et al., 1972), implica una mínima resposta inflamatòria perquè pràcticament no hi ha vessament del contingut citoplasmàtic al medi extracel.lular. Els trets bàsics són: condensació de cromatina, fragmentació internucleosomal del DNA, pèrdua del volum cel.lular, manteniment de la integritat membranal fins a fases tardanes, activació de caspases, aparició de cossos apoptòtics que *in vivo* seran fagocitats pels

macròfags circumdants, i síntesi de novo de proteïnes (Ankakrona M.,1995;Thornberry N.,1998; Lipton P.,1999).

L'apoptosi és un mecanisme de mort cel.lular molt important en el desenvolupament i en l'homeostasi dels organismes multicel.lulars (Kerr JFR, 1972). Darrerament però, també s'ha relacionat l'apoptosi amb malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer (Johnson EM., 1994) o el Parkinson (Mochizuki H. et al., 1996). En la isquèmia cerebral, la vinculació de l'apoptosi a la degeneració tardana de la penombra isquèmica és cada dia més acceptada (Choi D.W. et al., 1996). És per això que actualment, s'estan estudiant fàrmacs que bloquegen l'apoptosi, a més de l'excitotoxicitat, en les teràpies neuroprotectores post-isquèmiques.

L'activació dual de la necrosi i de l'apoptosi en la isquèmia cerebral ha generat molta controvèrsia a l'hora de discriminar els dos fenòmens, perquè les característiques establertes com a diferencials de cada procés es donen simultàniament (Choi D.W. et al., 1996; Linnik MD. et al.,1993; Lee JM. et al.,1999). Aquesta situació ha portat a molts investigadors a descartar l'apoptosi com a component del dany isquèmic.

En els accidents cerebrovasculars existeixen factors que podrien determinar la prevalència de la necrosi o de l'apoptosi, com per exemple, la durada de la isquèmia, el grau de maduresa neuronal, la disponibilitat de factors tròfics o bé la concentració intracel.lular de  $Ca^{2+}$  lliure ( Lipton, P.1999).

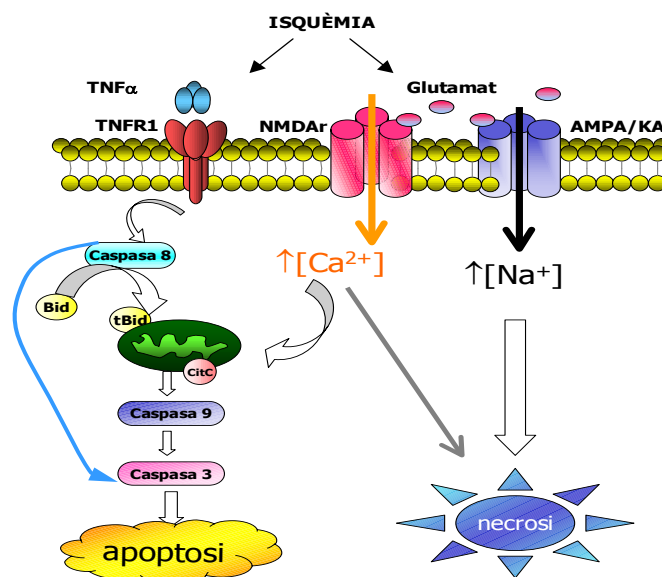
### **1.5.2. ACTIVACIÓ DE CASPASES EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL**

Les caspases són una família de cisteïn-aspartat proteases, que s'han identificat com a enzims responsables de la proteòlisi selectiva de proteïnes clau en la supervivència cel.lular (Nicholson, D.W. et al., 1997). Han estat reconegudes com les homòlogues en mamífers del producte del gen *ced-3*, descrit en el nemàtode *Caenorhabditis elegans* com a gen proapoptòtic implicat en processos de mort cel.lular durant el

desenvolupament embrionari. Això demostra que aquesta via de mort cel·lular s'ha conservat al llarg de l'evolució dels organismes eucariotes degut a la seva importància. En cèl·lules de mamífers s'han descrit fins al moment més de trenta proteïnes diana de les caspases, des de proteïnes del citoesquelet com l'espectrina i la gelsolina, fins a proteïnes senyalitzadores, com la Poli-(ADP-ribosa) polimerasa (PARP), presenilines, hungtintines i altres caspases (Thornberry, N.A. et al., 1998)

Les caspases es poden dividir en tres grans grups:

- Caspases implicades en la producció de citoquines: caspasa 1, 4, 5 i 13
- Caspases de senyalització o iniciadores: caspases 2,8,9 i 10
- Caspases efectores que hidrolitzen substrats selectius: caspases 3,6 i 7.



**Figura 1.4. Possibles mecanismes de mort cel·lular desencadenats per una isquèmia cerebral: paper del glutamat i el TNF $\alpha$ .** L'excés de glutamat comporta una sobrecàrrega de  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  a les cèl·lules via receptors ionotròpics del glutamat (NMDAr i AMPA/KAr). La sobrecàrrega iòica i l'alliberament de citoquines proinflamàtores com el TNF $\alpha$  també poden desencadenar l'activació de la maquinària apoptòtica. El balanç es decantaria cap a la necrosi o bé cap a l'apoptosi segons l'estat energètic de les cèl·lules.

Les caspases són sintetitzades com a proenzim de localització citosòlica, tot i que algunes també poden trobar-se en les mitocòndries o bé en el reticle endoplasmàtic. D'altres, un cop actives tenen la capacitat de translocar-se al nucli cel·lular (Tenneti L. et al., 2000).

Els processos d'activació de les caspases són molt diversos, però bàsicament es poden dividir en estímuls apoptòtics extracel·lulars mediats per receptors, com el receptor del factor de necrosi tumoral (TNFR), o bé estímuls intracel·lulars. Aquests estímuls intracel·lulars poden ser induïts per missatgers secundaris com la ceramida o el calci, per orgànuls, com la mitocòndria o el reticle endoplasmàtic o bé per l'acció d'altres proteases (vegeu figura 1.4).

Les caspases que s'han implicat fins ara en l'execució de l'apoptosi isquèmica són la caspasa 1 i la caspasa 3, tot i que hi ha altres caspases implicades en el processament i activació de les esmentades (Dirnagl U. et al., 1998; Lee, J.M. et al., 1999; Hara, H. et al. 1997). Existeixen inhibidors peptídics específics que s'uneixen covalentment al seu seti actiu (Thornberry, N.A. et al., 1998). Gràcies a la seva especificitat s'han pogut realitzar estudis per determinar la funció de les caspases i estudiar-ne la seva aplicació terapèutica (Hara, H. et al., 1997; Gottron, F.J. et al., 1997) Així, s'ha pogut concloure que la caspasa 1 catalitza la producció de la IL-1 $\beta$ , citoquina molt important en processos inflamatoris; s'ha descrit que la seva inhibició pot reduir l'aparició de la inflamació i l'edema cerebral, tot i que també es va observar una reducció de l'apoptosi neuronal (Hara, H. et al., 1997). Pel que fa a la caspasa 3, s'ha pogut comprovar que el seu paper en l'apoptosi neurogènica és molt important ja que en estudis en ratolins *knock out* d'aquesta proteasa, el desenvolupament del cervell és anormal i presenta alteracions estructurals (Nicholson DW. et al., 1997). Els estudis realitzats en els darrers anys en isquèmia cerebral demostren que, la caspasa 3 és la principal executora del programa de mort, seguida per la caspasa 7. Així, s'ha observat que el

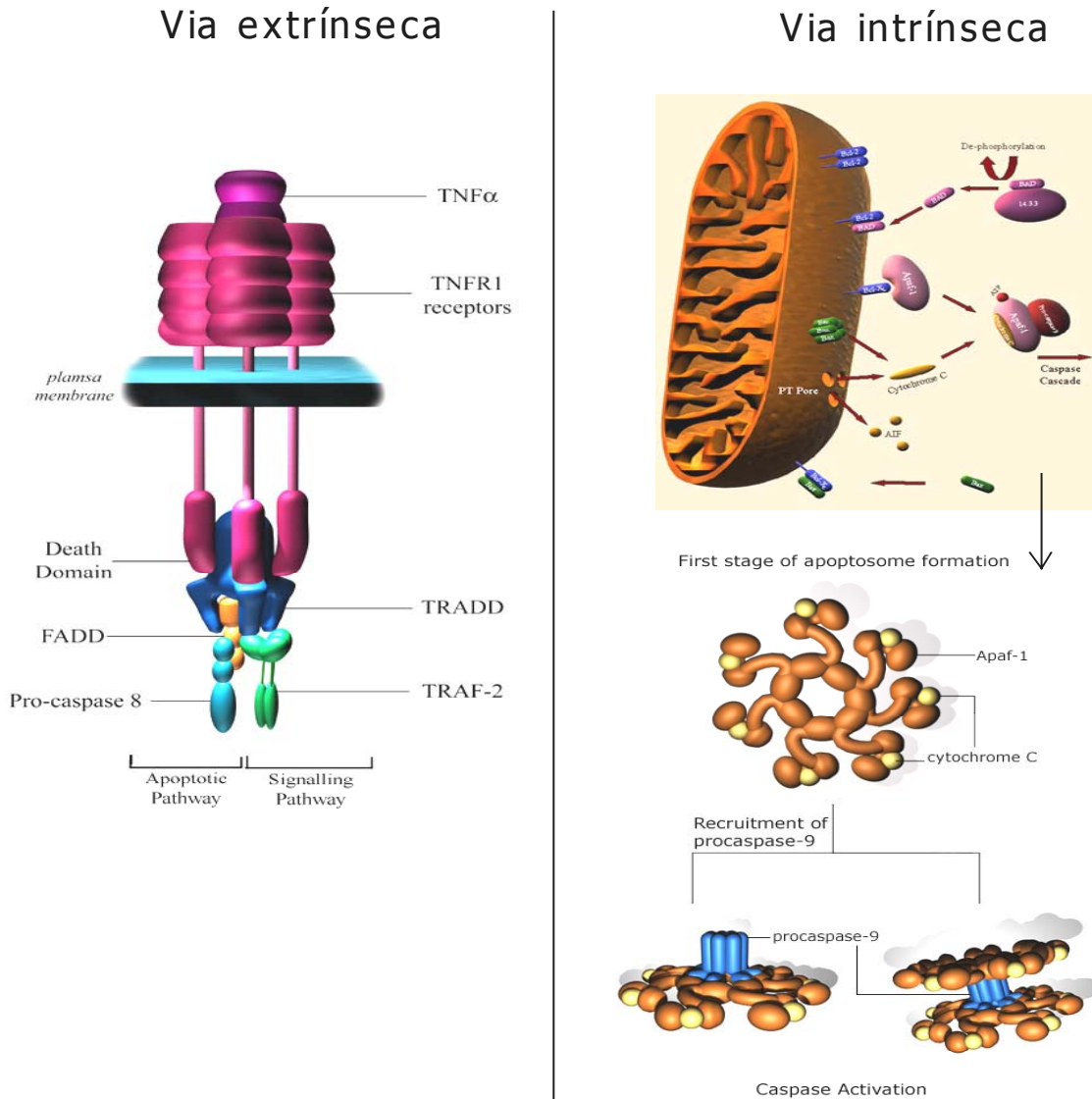
seu bloqueig *in vivo* amb diferents inhibidors produïa una reducció en el volum d'infart en el cervell (Dirnagl U. et al.,1998; Namura S. et al.,1998; Gottron, F.J. et al.,1997). Per altra banda, en experiments d'isquèmia focal en rates, es va observar la presència de la seva forma activa en neurones corticals (Namura S. et al.,1998), concretament en neurones de la lamina II/III i en la microglia del nucli isquèmic (Velier JJ. et al.,1998). La caspasa 3 pot ser activada per dues vies diferents:

- **la via extrínseca:** mitjançant la caspasa 8 , que és activada mitjançant la unió del lligand (TNF,FAS Ligand) al receptor extracel.lular de mort(TNFR,CD95), tal com s'aprecia a la figura 5. La caspasa 8 pren importància degut a la seva posició apical de la cascada apoptòtica. En models d'isquèmia focal en rates, la caspasa 8 activa es visualitza en les neurones piramidals de la lamina V del còrtex, sis hores després de l'oclusió (Velier JJ. et al.,1998).
- **la via intrínseca:** mediada per la caspasa 9 i activada per factors mitocondrials que portarien a la formació de l'apoptosoma (APAF1-Citocrom C-procaspasa 9) (vegeu figura 1.5).

Aquestes dues vies poden connectar-se si la caspasa 8 processa una proteïna anomenada BID, la família de BCL2, ja que la seva forma truncada transloca a la mitocondria i pot provocar la sortida del citocrom C (Yin XM. et al.,2002) (vegeu figura 1.4).

En els darrers anys, altres caspases han estat implicades en l'apoptosi isquèmica. Així, la caspasa 11 s'ha proposat com a proteasa activadora de la caspasa 3 en processos patològics com la isquèmia, ja que en sotmetre ratolins *knock out* deficientes de caspasa 11 a una isquèmia focal, el nivell d'activació de la caspasa 3 es va veure reduït (Kang SJ. et al.,2000). La caspasa 12 ha estat l'última proteasa de la família implicada en els processos apoptòtics isquèmics. La caspasa 12 resideix al reticle endoplasmàtic i s'activa en situacions d'estrés cel.lular, com una sobrecàrrega de  $Ca^{2+}$  al reticle. En una

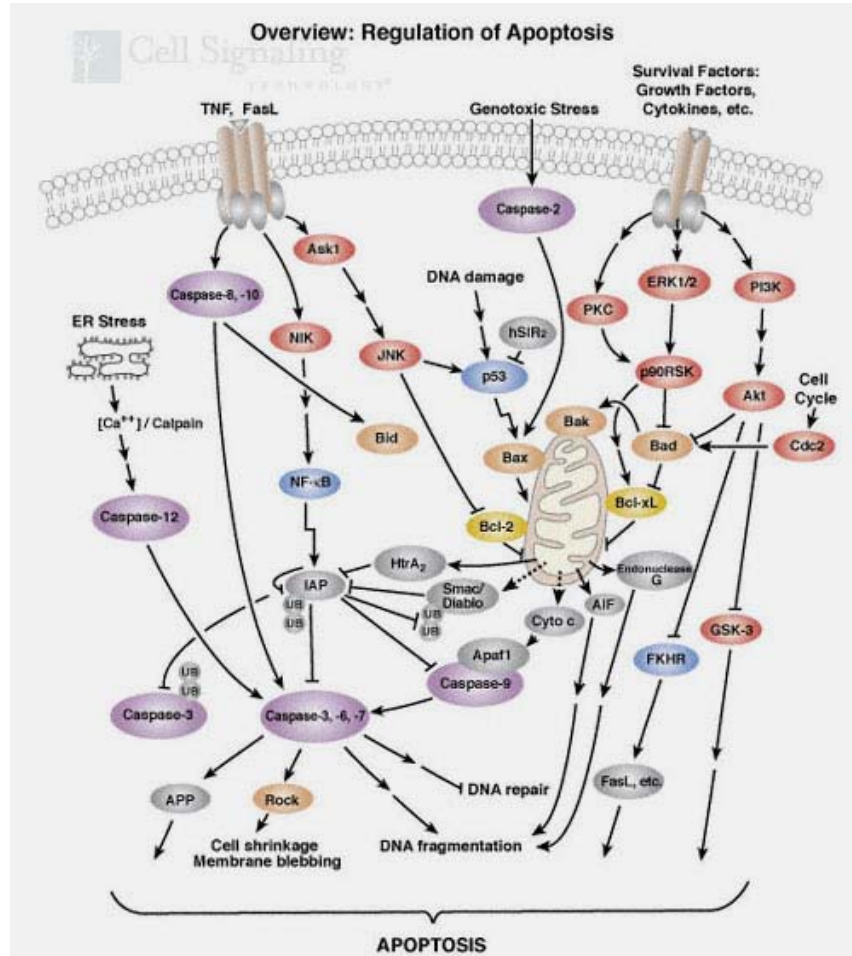
isquèmia focal la seva expressió s'ha vist augmentada tant en còrtex com en estriat (Mouw G. et al.,2003)



**Figura 1.5. Vies d'activació de la caspasa 3.** La via extrínseca depèn de la unió del lligand al receptor de mort (TNFR), que provoca el processament de la caspasa 8 i origina l'activació de la via apoptòtica. La via intrínseca depèn de l'alliberament del citocrom C des de la mitocondria. Un cop al citosol s'uneix amb APAF1 i després amb la procaspasa 9 per constituir l'apoptosoma. <http://www.sghms.ac.uk/depts/immunology/%7Edash/apoptosis.html>

### **1.5.3. ALTRES PROTEÏNES CLAU EN L'APOPTOSI NEURONAL :**

En una isquèmia cerebral hi ha moltes proteïnes que entren en joc en el balanç pro i anti-apoptòtic. La família de proteïnes Bcl2 és crucial per a la transducció de la senyal apoptòtica. Aquesta família de gens inclou proteïnes tan anti com pro-apoptòtiques que contenen un o més dominis d'homologia Bcl-2 (BH). Les dues principals proteïnes antiapoptòtiques són Bcl-2 i Bcl-x<sub>l</sub>. Estan localitzades a la membrana mitocondrial, al reticle endoplasmàtic i a la membrana nuclear. Bcl-2 i Bcl-x<sub>l</sub> desenvolupen la seva funció antiapoptòtica heterodimeritzant amb els membres proapoptòtics de la família, com Bax, produint així la seva inhibició (Cao G. et al., 2001). Altres factors imprescindibles per a la supervivència neuronal tant en processos de mort com en desenvolupament són els factors tròfics o neurotrofines. Les neurotrofines exerceixen la seva funció a través de receptors TrK (TrkA, TrkB i TrkC), amb activitat tirosina quinasa. Aquests receptors de membrana s'autofosforilen i proteïnes com la fosfolipasa C gamma (PLC $\gamma$ ) o la Fosfoinosítid- 3 quinasa (PI3K) poden ancorar-se als residus fosforilats de tirosina. La PI3K activa catalitza la formació de PIP3, el qual activa la Ser/Thre quinasa Akt. L'Akt està relacionada en vies de senyalització de supervivència i la seva activació es tradueix en la fosforilació de BAD (Krajewski S. et al.,1999; Noshita N. et al.,2001; Wang SJ. et al.,2002;). La xaperona 14.3.3 segrasta la forma de BAD fosforilada i en bloqueja la seva funció proapoptòtica. L'Akt també pot fosforilar altres proteïnes com els factors de transcripció CREB o NFkB (vegeu figura 1.6). Fins i tot pot fosforilar la caspasa 9 per tal de bloquejar la formació de l'apoptosoma (Mouw G. et al.,2002; Wang SJ. et al.,2002; Yuan J. et al., 2000)



**Figura 1.6. Regulació de l'apoptosi.** L'esquema indica la complexitat de les diferents vies de transducció de senyals que han estat implicades fins al moment en l'apoptosi cel.lular . Les caspases són els reguladors principals de l'apoptosi però hi ha molts factors que en regulen la seva activació, com la família de proteïnes Bcl-2, que regulen la sortida del citocrom C de la mitocondria. Aquestes proteïnes alhora estan regulades per quinases com AKT , RSK o JNK, l'activitat de les quals depèn dels receptors de membrana de citoquines o de factors de creixement. [http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Ovrvw\\_apop.asp](http://www.cellsignal.com/reference/pathway/Ovrvw_apop.asp)

## 1.6. PAPER DEL TNF $\alpha$ EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL

La modulació de la mort neuronal isquèmica depèn de factors molt diversos, a part del paper principal ja esmentat de l'excitotoxicitat del glutamat. Altres neurotransmissors, com per exemple la histamina o el GABA poden decantar la balança de mort-supervivència , a través dels seus propis receptors o altres vies. També cal destacar la privació de neurotrofines que sofreix el teixit isquèmic, i que es tradueix en una



deprivació de senyals de supervivència. En canvi, les citoquines proinflamatòries, com el factor de necrosi tumoral ( $TNF\alpha$ ), poden desenvolupar papers duals de mort o supervivència segons on i quan exerceixin la seva funció (Wang CX. et al.,2002).

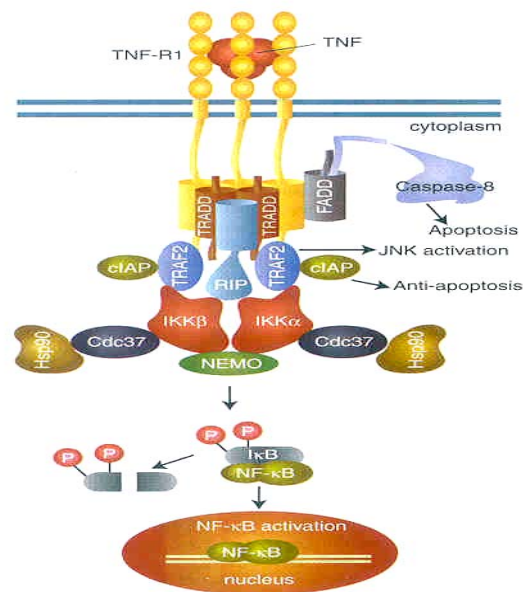
### **1.6.1. EL $TNF\alpha$ EN EL SNC**

El  $TNF\alpha$  és una proteïna homotrimèrica d'uns 157 KDa, produïda principalment per macròfags, microglia i astròcits activats. El  $TNF\alpha$  és alliberat en la seva forma soluble per mitjà d'una proteasa dependent de zinc i ancorada a la membrana, anomenada TNF-alfa convertasa (TACE) o altrament coneguda com ADAM 17 ( Wang CX. et al.,2002). Deu el seu nom a la seva capacitat de destruir certs tipus de cèl.lules tumorals tot i que també pot arribar a ser tòxic per algunes classes de cèl.lules normals (Tracey KJ. et al.,1994 ;Wong GH. et al., 1995). El  $TNF\alpha$  s'ha involucrat tant en el desenvolupament normal del cervell com en desordres neurològics com l'Alzheimer, l'esclerosi múltiple, el Pàrkinson o la isquèmia cerebral ( Barone FC. et al., 1997). S'ha demostrat que les neurones corticals postisquèmiques presenten un augment de  $TNF\alpha$  , tant a nivell del seu mRNA com a nivell proteic ( Liu T. et al., 1994) . El  $TNF\alpha$  pot ser tròfic o tòxic, depenent del tipus de cèl.lules diana o dels diferents subtipus de receptor que activa. Per exemple, s'ha demostrat que el  $TNF\alpha$  pot induir la mort de neurones corticals o oligodendròcits humans en cultiu (Yang L. et al.,, 2002). D'altra banda, hi ha treballs que apunten a la funció tròfica del  $TNF\alpha$  ( Bruce AJ. et al.,1996; Tamatani M. et al.,, 1999) Tanmateix, els mecanismes pels quals el  $TNF\alpha$  exerceix les seves múltiples funcions romanen per esclarir.

### 1.6.2. RECEPTORS DEL TNF $\alpha$ I VIES DE TRANSDUCCIÓ ASSOCIADES

El TNF $\alpha$  exerceix la seva activitat biològica mitjançant dos tipus de receptors, TNFR1 i TNFR2 i activa diverses vies de senyalització en molts tipus cel·lulars (Tracey KJ. et al., 1994; Tang G. et al., 2001). El complex de senyalització del TNFR1 (vegeu figura 1.7) està compost pel receptor trimeritzat, i diverses proteïnes associades com la TRADD, la FADD, la TRAF2 i la RIP, (Locksley RM., 2001). La FADD recluta i activa la procaspasa 8 (Muzio M, 1996) i inicia la via proapoptòtica, o bé activant directament la caspasa 3 o bé processant BID, de la família Bcl-2, i provocant la sortida del citocrom C de la mitocòndria.

**Figura 1.7. El receptor TNFR1.** La unió del TNF $\alpha$  al seu receptor desencadena la formació de complexos de proteïnes adaptadores com TRADD o FADD. Aquestes ancoren proteïnes clau tant per la via apoptòtica com per la via de senyalització i promouen l'activació de la caspasa 8, de les cIAPs o dels factors de transcripció, com el NF $\kappa$ B o JNK. (Chen G., 2002)



D'altra banda, TRAF2 i RIP recluten les cIAPS, que són inhibidors de proteïnes apoptòtiques; TRAF2 i RIP també medien l'activació de la JNK i de IKK, les quals activen cJUN i NFκB. L'activació d'aquests factors de transcripció induïx l'expressió d'una sèrie de proteïnes capaces d'afavorir o bloquejar la via apoptòtica activada per TNFα. (Tang G. et al., 2001)

El complex de senyalització del TNFR2 es troba menys caracteritzat però se sap que la unió del TNFα amb el receptor activa una esfingomielinasa àcida que degrada esfingomielina i allibera ceramida (Kolesnick R. et al., 1994). Hi ha evidències que la ceramida activa una quinasa (IKKb) que fosforila IκB, la subunitat inhibidora del NFκB, induint-ne així la seva degradació. D'aquesta manera el NFκB s'activa i es transloca al nucli per promoure l'expressió de diverses proteïnes (Mattson MP. et al., 1998).

### **1.6.3. EL TNFα EN LA LESIÓ CEREBRAL ISQUÈMICA**

La concentració de TNFα en condicions normals es troba a nivells molt baixos en el cervell però en resposta a lesions cerebrals com la isquèmia o patologies com l'Alzheimer, pot augmentar entre 100 i 1000 vegades (Barone FC. et al., 1997). Aquest increment de TNFα sol presentar un pic d'entre 2 o 4 hores després de l'agressió. Aquesta resposta tan ràpida difereix dels pics de factors de creixement com el bFGF o les neurotrofines en les mateixes condicions lesives. Tal com s'ha comentat anteriorment, el paper del TNFα en la lesió cerebral induïda per isquèmia no està encara ben clarificat. Per una banda, hi ha evidències del seu paper neuroprotector. Així s'ha observat que el pretractament amb TNFα protegeix els cultius de neurones hipocampals i corticals del dany induït per la privació de glucosa, de la toxicitat per glutamat o del dany degut a agressions oxidatives (Mattson MP. et al., 1998). Aquests autors demostren que, davant la toxicitat per glutamat, el pretractament amb

TNF $\alpha$ , suprimeix l'augment de calci intracel·lular mitjançant l'augment en l'expressió de calbindina, proteïna que uneix aquest catió, regulant-ne la seva homeostasi. Addicionalment, també queda suprimida la formació d'espècies reactives de l'oxigen induint l'expressió d'enzims antioxidants com la MnSOD. El factor de transcripció NFkB s'activa amb el pretractament amb TNF $\alpha$ , augmentant la seva capacitat d'unió al DNA i promouria la transcripció d'aquests gens, entre altres (Bruce AJ. et al.,1996). També s'han trobat evidències que el pretractament amb TNF $\alpha$  protegeix les neurones hipocampals davant la hipòxia o vers exposicions a òxid nítric (NO), mitjançant l'increment de l'expressió de proteïnes de la família Bcl, com Bcl2 i Bclx a través també de l'activació de NFkB (Tamatani M. et al.,1999).

Contràriament a les evidències que permeten proposar el paper neuroprotector del TNF $\alpha$  *in vitro*, l'alliberament d'aquesta citoquina durant la isquèmia sembla ser tòxica. Barone i col.laboradors (1997) van demostrar que l'addició de TNF $\alpha$  exogen durant una MCAO en rates augmentava notablement el volum d'infart d'una manera dosi dependent. En afegir anticossos monoclonals o receptors solubles del TNF $\alpha$  es revertia l'efecte del TNF $\alpha$  endogen alliberat durant la isquèmia. Però la toxicitat del TNF $\alpha$  no semblava ser per un efecte directe sobre les neurones o per modulació de la sensibilitat d'aquestes vers el glutamat o les ROS, sinó que semblava venir mediat per cèl·lules no neuronals. En els períodes inicials de la lesió isquèmica, l'activació de la via de senyalització del TNF $\alpha$  podria ser neuroprotectora, però l'activació a llarg plaç podria ser nociva ja que el TNF $\alpha$  és un activador molt potent de la microglia i dels macròfags. Aquestes espècies cel·lulars, quan s'activen produeixen una sèrie de substàncies tòxiques per a les neurones (Mattson MP. et al, 1997) i això contribuiria a l'extensió de la lesió.

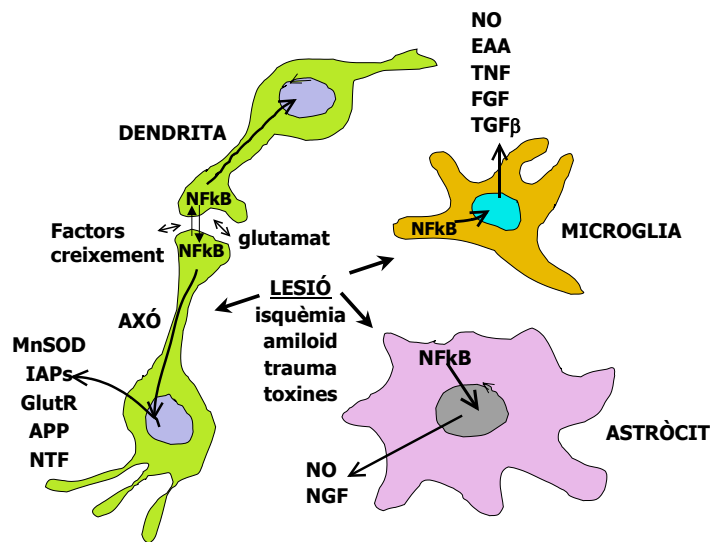
Pel que al paper dels receptors del TNF $\alpha$ , se sap que el TNFR1 experimenta una *upregulation* en neurones unes 6 hores després d'una isquèmia focal (Botchkina GI. et

al., 1997). Estudis recents en ratolins *knock out* per als receptors del TNF, demostren les diferències que existeixen entre el TNFR1 i el TNFR2 . Les neurones hipocampals en cultiu de ratolins TNFR1(-/-) no veuen afectada la seva viabilitat amb l'addició de TNF $\alpha$  i tampoc presenten translocació al nucli del NF $\kappa$ B. En canvi, en cultius de ratolins TNFR2(-/-), les neurones hipocampals són molt més sensibles a la toxicitat del TNF i s'aprecia una evident activació de NF $\kappa$ B. Es va suggerir doncs que, en neurones hipocampals de ratolí, l'efecte tòxic del TNF vindria mediat pel TNFR1 i l'efecte tròfic pel TNFR2. Aquesta dualitat de funció del TNF $\alpha$  ha portat a hipotetitzar que la supervivència neuronal depèn del subtipus de receptor que expressin les neurones de manera majoritària, tant durant el desenvolupament com en malalties neurològiques com la isquèmia cerebral (Yang L. et al., 2002).

#### **1.6.4. IMPORTÀNCIA DEL NF $\kappa$ B EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL**

El factor nuclear  $\kappa$  B (NF $\kappa$ B) és un factor ubicu de transcripció que s'activa en resposta a processos inflamatoris o a estrès oxidatiu causat, per exemple, per hipòxia/reoxigenació (Siebenlist U. et al.,1994; Baldwin AS., 1996). Segons el tipus de cèl·lules on s'activa i segons els estímuls que n'indueixen l'activació, el NF $\kappa$ B pot inhibir o promoure la mort cel·lular per apoptosi (Sonenshein GE.,1997). En el sistema nerviós central de mamífers, el NF $\kappa$ B es troba expressat en neurones, astròcits, microglia i oligodendròcits. Així, s'ha descrit que l'activació del NF $\kappa$ B pot protegir les neurones hipocampals de l'apoptosi induïda per estrès oxidatiu (Mattson MP., 1997) o per hipòxia (Tamatani M. et al., 1999). Contràriament, treballs recents demostren que l'activació del NF $\kappa$ B indueix la mort neuronal en ratolins sotmesos a una isquèmia cerebral focal (Schneider A. et al.,1999)

A nivell molecular, el NFκB consta de tres subunitats, les dues primeres classificades pel seu pes molecular p50 i p65, i la tercera anomenada IKBα. El mecanisme d'activació consisteix en la fosforilació de la subunitat IKBα per la quinasa IKK. L'IKBα fosforilat es dissocia del dímer p50-p65 i és degradat via proteosoma. Un cop lliures, els dímers es transloquen al nucli per unir-se a seqüències de consens κB en la regió encebadora de gens de resposta κB (Mattson MP. & Camandola S., 2001) La seva activació depèn de vies de senyalització associades a receptors, com per exemple, la via del TNFα, tant en neurones com en glia. Hi ha diferents senyals que activen el NFκB a part del TNFα, com els augments intracel·lulars de Ca<sup>2+</sup>, els radicals lliures, el glutamat o missatgers secundaris com la ceramida (Tamatani M. et al., 1999; Mattson MP. & Camandola S., 2001).



**Figura 1.8. El NFκB en una lesió isquèmica cerebral.** Hi ha una senyalització integrada entre neurones, astròcits i microglia. MnSOD, superoxid dismutasa Manganès depenent; IAPs, proteïnes inhibidores de l'apoptosi; GlutR, subunitats dels receptors de glutamat; NTF, factor neurotròfic; EAA, aminoàcids excitatoris; NO òxid nítric. (esquema adaptat de Mattson MP et al, 2001)

En neurones, la seva activació induïx l'expressió de proteïnes tant antiapoptòtiques com proteïnes proapoptòtiques (veure figura 1.8).

A nivell glial, l'activació del NF $\kappa$ B resulta en la producció de citokines proinflamatòries (TNF $\alpha$ ), espècies reactives de l'oxigen o ROS o excitotoxines que provoquen una degeneració neuronal. Així doncs, el NF $\kappa$ B està implicat en les respostes generades en resposta a una lesió cerebral, tant en condicions neurodegeneratives cròniques com agudes. Per tant, els membres de la seva via de senyalització són dianes potencials per a una possible intervenció terapèutica en el tractament de la isquèmia cerebral.

## **1.7. LA CERAMIDA**

### **1.7.1. SÍNTESI DE CERAMIDA**

La ceramida és un lípid de membrana que també pot actuar com a missatger secundari. Intervé en processos de divisió o proliferació cel.lulars. i també en respostes a l'estrès cel.lular. La seva acumulació indueix una mort cel.lular que té totes les característiques d'una mort per apoptosi (Obeid LM. et al.,1993). De fet, la ceramida promou l'expressió de gens relacionats amb la maquinària apoptòtica i, a més, indueix l'activació de caspases, tot i que els mecanismes implicats no estan del tot estudiats (Basu S. et al.,1998, Hartfield PJ. et al., 1998; Pettus BJ. et al., 2002).

Agonistes com el TNF $\alpha$  , el lligand FAS per via dels seus receptors o processos com la isquèmia/reperfusió regulen un o més enzims del metabolisme de la ceramida i en provoquen l'acumulació. La ceramida pot ser producte del catabolisme de l'esfingomielina per uns enzims anomenats esfingomielinases. S'han descrit uns cinc tipus d'esfingomielinases i s'han classificat segons el seu pH òptim i la seva localització. D'aquestes cinc, s'ha demostrat que l'esfingomielinasa àcida i la neutra poden produir una acumulació de ceramida. Durant una isquèmia focal, la ceramida endògena és produïda per la degradació de l'esfingomielina per l'esfingomielinasa àcida (SMA<sub>a</sub>).

Aquest esdeveniment s'ha relacionat amb l'aparició de la mort cel·lular isquèmica. (Mattson MP. et al., 2000)

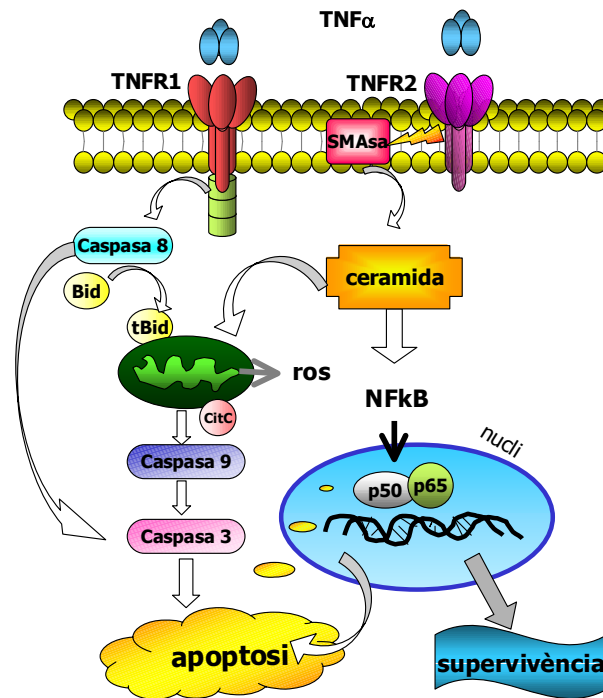
D'altra banda, la ceramida també pot ser sintetitzada *de novo* amb la condensació d'una L-serina amb un palmitoil-CoA. Posteriorment, la cetosfinganina resultant es redueix a esfinganina. La ceramida sintasa n-acetila l'esfinganina i produeix dihidroceramida, la qual és dessaturada a ceramida (Kolesnick R & Golde DW., 1994) .

### **1.7.2. CERAMIDA I APOPTOSI**

Per a relacionar de manera directa l'acumulació de ceramida i l'activació de l'apoptosi, cal fer referència a les seves proteïnes diana i als mecanismes associats. La ceramida pot regular directament l'activitat de proteïnes quinasa (CAPKs) com la quinasa supressora de ras (KSR) o la PKC $\delta$ . També activa serina/treonina fosfatases com la PP2A o la PP1, els substrats de les quals estan implicats en la cascada apoptòtica, com Bcl2, l'Akt o la PKC $\alpha$ .

Les funcions de la ceramida poden dependre de la seva localització topològica dins la cèl·lula. Així, es pot trobar ceramida a la membrana nuclear, al reticle endoplasmàtic, a la membrana citoplasmàtica o a la mitocòndria. Concretament , en aquest últim cas, s'ha associat la ceramida a la inducció de l'apoptosi perquè pot inhibir directament el complex III de la cadena de transport electrònic. A més, diversos efectes *downstream* de la ceramida convergeixen en la mitocòndria. Així, les CAPPs estan implicades en la desfosforilació de Bcl2 i la quinasa de Bcl2. Aquestes desfosforilacions indueixen un alliberament del citocrom C i una conseqüent activació de la caspasa 9. També les fosfatases estan implicades en la desfosforilació de l'Akt/PKB. Això provoca una desfosforilació de la caspasa 9 i de BAD que desemboca de nou en una activació de l'apoptosoma.





**Figura 1.9. Efecte del TNF $\alpha$  en la isquèmia cerebral: paper del NF $\kappa$ B.** La unió del TNF $\alpha$  als seus receptors activa la via apoptòtica amb les caspases com a enzims claus de la via. El TNF $\alpha$  però també activa la via del factor de transcripció NF $\kappa$ B mitjançant la ceramida. El NF $\kappa$ B induirà l'expressió de gens que codifiquen per proteïnes que modulen positiva o negativament la supervivència cel·lular

La caspasa 8, associada al receptor TNFR1 en forma de proenzim, és necessària per a la formació de ceramida ja que en presència de Z.VAD.FMK, un paninhibidor caspàtic, però no d'inhibidors de caspases executores com la caspasa 3, hi ha una disminució en la producció de ceramida. Aquesta producció de ceramida és *upstream* de l'activació del NF $\kappa$ B, que és una peça clau en la via activada pel TNF $\alpha$  en les respostes inflamatòries i apoptòtiques. (Mathias S. et al.,1998; Hofmann K. et al.,1998; Pettus BJ. et al.,2002).

Recentment, s'ha descrit que el TNF $\alpha$  pot activar la síntesi *de novo* de ceramida i posar en marxa la maquinària apoptòtica. La fumonisina B1, que és un inhibidor de la síntesi *de novo*, pot bloquejar aquesta apoptosi (Dbaibo GS. et al., 2001). S'ha postulat que aquesta ceramida activaria la fosfatasa PP1 que desfosforilaria les proteïnes SR, que són proteïnes que controlen l'*splicing* constitutiu i alternatiu. Si es desfosforilen l'*splicing* de la caspasa 9 o de Bcl<sub>x</sub> es poden veure afectats i promoure l'activació de la cascada apoptòtica. Aquest fet suggereix que la síntesi *de novo* de ceramida, a més de

la producció de ceramida mitjançant l'activació de les esfingomielinases, exerceix un paper important en l'activació del programa de mort.

### **1.7.3. RELACIÓ ENTRE LA CERAMIDA I LA MORT APOPTÒTICA EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL.**

En la bibliografia hi ha treballs que descriuen augments en la quantitat de ceramida després d'una isquèmia focal transitòria (Kubota M. et al.,1996; Nakane M. et al.,2000) que provindria de la degradació de l'esfingomielina. L'acció de l'esfingomielinasa àcida (ASMasa) ha estat proposada com a peça clau en la producció de ceramida a partir de l'esfingomielina (Mattson MP. et al.,1997), ja que en ratolins *knock out* per ASMasa, s'ha demostrat una reducció de la vulnerabilitat vers l'excitotoxicitat o vers la hipòxia (Yu ZF. et al., 2000). Per això, la producció de ceramida en una isquèmia cerebral s'ha atribuït sempre a l'acció de la ASMasa . Tot i així, han anat sorgint indicis que la ceramida sintetitzada *de novo* pot tenir una importància creixent en la inducció de l'apoptosi cel.lular (Blázquez C. et al.,2000).

## **1.8. LA HISTAMINA COM A MODULADORA DE LA LESIÓ ISQUÈMICA**

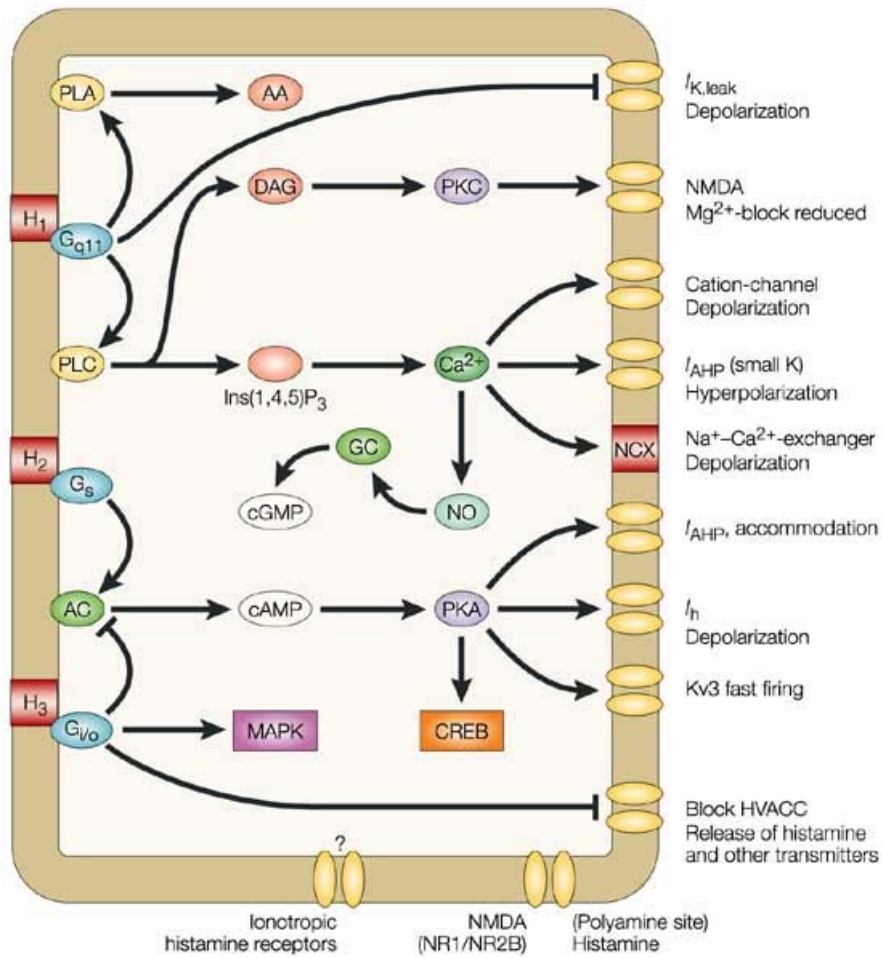
### **1.8.1. PAPER NEUROMODULADOR DE LA HISTAMINA EN EL SNC**

El sistema histaminèrgic es projecta a gairebé totes les zones del cervell a partir dels nuclis tuberomamilar de l'hipotàlem. Aquest fet sembla indicar que la histamina, en el SNC, actuaria com a moduladora de la neurotransmissió, tant en condicions normals com en condicions patològiques (Prell GD. et al.,1986). La histamina és sintetitzada al

cervell a partir de la L-histidina mitjançant l'enzim Histidina descarboxilasa (HDC EC. 4.1.1.22.). No gaudeix d'un sistema de transport d'alta afinitat, com és el cas del glutamat, però van sorgint evidències que la glia podria estar implicada en la seva inactivació (Hustzi Z. et al., 1998). La seva acció és finalitzada per l'enzim Histamina N-metiltransferasa (HMT, EC 2.1.1.8) (Prell GD. et al., 1986).

### **1.8.2. RECEPTORS HISTAMINÈRGICS EN EL SNC**

Un cop alliberada, la histamina pot activar quatre tipus de receptors. Els receptors H1 estan situats principalment a nivell postsinàptic, estan acoblats positivament a la fosfolipasa C i la seva activació provoca una despolarització de membrana. Els receptors H2 també són postsinàptics però estan acoblats positivament a l'adenilil ciclase. L'activació d'aquests receptors concretament, exerceix un efecte excitatori mitjançant el bloqueig dels canals de potassi dependents de calci i també per la modulació de canals catiónics activats per hiperpolarització. Els receptors H3 són presinàptics i estan acoblats negativament a una adenilil ciclase. Estan associats principalment a la inhibició de l'alliberament d'histamina o d'altres neurotransmissors inhibint l'obertura dels canals de calci presinàptics (vegeu figura 10). L'últim receptor de la histamina en descobrir-se ha estat el receptor H4 el qual, fins al moment, no ha estat localitzat en el SNC (Haas H. et al, 2003). Finalment, la histamina també s'uneix al receptor del glutamat NMDA, al seti d'unió de les poliamines (Vorobjev VS., 1993).



Nature Reviews | Neuroscience

**Figura 1.10. Vies de senyalització activades pels receptors d'Histamina.** Els receptors d'histamina i les proteïnes G acoblades es mostren a l'esquerra de la figura; les dianes membranals dels receptors activats es mostren a la dreta. La part central conté les vies de senyalització i les dianes intracel·lulars. AA, àcid araquidònic; AC, adenilil ciclasi; CREB, proteïna d'unió a l'element de resposta a c AMP (CRE); DAG, diacilglicerol; GC, guanilil ciclasi; HVACC, corrent de Ca<sup>2+</sup> activada per alt voltatge; IAHP, corrent de K<sup>+</sup> dependent de Ca<sup>2+</sup>; I<sub>h</sub>; corrent catiónica activada per hiperpolarització; I<sub>K</sub> leak, pèrdua de corrent de potassi; Ins(1,4,5)P<sub>3</sub>, inositol-1,4,5-trifosfat; MAPK, quinasa activada per mitògens; NCX, intercanviador dels cations Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>; NMDA, N-metil-D-aspartat; NO, òxid nítric; PKA, proteïna quinasa A; PKC, proteïna quinasa C; PLA, fosfolipasa A; PLC, fosfolipasa C.(Haas H.,2003)

### 1.8.3. IMPLICACIÓ DEL SISTEMA HISTAMINÈRGIC EN LA ISQUÈMIA CEREBRAL

En els últims anys, el sistema histaminèrgic ha anat prenent rellevància en el seu paper neuromodulador del dany cerebral induït per isquèmia. S'han descrit, tant en models d'isquèmia *in vitro* (Shibata S. et al.,1993) com en models d'isquèmia *in vivo* (Fujitani T. et al.,1996), les propietats neuroprotectores d'alguns antagonistes histaminèrgics. Tot i així, és un camp molt poc explorat i segons el sistema d'estudi utilitzat els resultats poden ser aparentment contradictoris (vegeu taula 1.1) . També cal tenir present que la histamina interacciona amb el receptor NMDA (Vorobjev VS. et al.,1993; Bekkers JM. et al.,1993), fet que podria modular la toxicitat d'aquest neurotransmissor en una isquèmia.

**Taula 1.1. Antecedents de la implicació del sistema histaminèrgic en la isquèmia cerebral.**

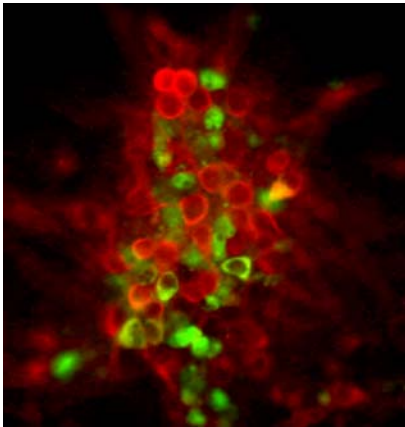
<b>Any publicació</b>	<b>Autor</b>	<b>Conclusió</b>
1992	Adachi N et al..	Evidències de l'alliberament d'histamina en l'estriat després d'una oclusió de la caròtida mitja en rates
1993	Adachi N. et al	L'alteració del sistema histaminèrgic agreuja el dany neuronal isquèmic
1993	Shibata S. et al	Els antagonistes H1 són neuroprotectors en una lesió isquèmica
1994	Tósaki A. et al	La ranitidina (anti H2) redueix la formació de l'edema cerebral causat per una oclusió de la caròtida mitja en rates

D'altra banda, hi ha estudis que descriuen que la histamina augmenta l'alliberament de glutamat en condicions despolaritzants (Rodriguez FJ. et al.,1997).

Tots aquests antecedents permeten pensar en la possibilitat d'una interacció del sistema histaminèrgic amb el sistema glutamatèrgic en un accident cerebrovascular.

Per tant, l'estudi d'aquesta interacció d'aquests dos sistemes en la isquèmia cerebral pot obrir un gran ventall de possibilitats terapèutiques per aturar la neurodegeneració consegüent a un accident cerebrovascular.

## **2. OBJECTIUS**



- ADAPTAR UN MODEL D'ISQUÈMIA CEREBRAL *IN VITRO* PER A CULTIUS NEURALS DE RATA QUE PERMETI ESTUDIAR ELS MECANISMES DE MORT CEL.LULAR
- CARACTERITZAR EL DANY CEL.LULAR I IDENTIFICAR ELS COMPONENTS QUE CONSTITUEIXEN LA MORT CEL.LULAR INDUIDA PER ISQUÈMIA: LA NECROSI I L'APOPTOSI
- EXPLORAR ELS FACTORS I LES VIES DE SENYALITZACIÓ QUE DETERMINEN L'APARICIÓ DE L'APOPTOSI CEL.LULAR ISQUÈMICA
- INVESTIGAR EL PAPER DEL SISTEMA HISTAMINÈRGIC EN LA MORT CEL.LULAR ISQUÈMICA.